Aus dem Hygienischen Institut der Universität Tübingen
Vorstand: Prof. Dr. K. Wolf

Ueber die Resistenz säurefester Bazillen gegenüber 10%iger Schwefelsäure

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe

einer

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Friedr. Wilhelm van Gelder

aus Rindern (Rheinprovinz)

1933

Buchdruckerei Albert Becht, Tübingen, Hirschgasse 16

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.

Dekan: Prof. Dr. Gaupp.
Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Saleck.

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Juni 1933.

Meinen lieben Kindern gewidmet

I. Diagnostische Probleme, Morphologie und Physiologie der säurefesten Bazillen.

Seit der Entdeckung des Tuberkelbazillus durch Robert Koch im Jahre 1882 ist die Forschung und das Studium über diesen wichtigen Erreger nicht mehr zum Stillstand gekommen, und die Literatur darüber ins Unübersehbare angewachsen.

Dies ist nicht verwunderlich, wenn man bedenkt, daß die Tuberkulose eine der Krankheiten ist, die am meisten am Mark der Völker zehren und bis in die neueste Zeit hinein die zahlreichsten Todesopfer gefordert haben. So sind es vor allem diagnostische und therapeutische Probleme, die den Bakteriologen unablässig beschäftigen: Denn möglichst frühzeitig und ganz untrüglich soll die Krankheit erkannt werden, und auf der andern Seite lockt der Gedanke, mit Hilfe einer Schutz- oder Heilimpfung erfolgreich in das epidemiologische und das Krankheitsgeschehen selbst einzugreifen.

Von besonderer Wichtigkeit ist in vielen Fällen tuberkulöser Erkrankungen der einwandfreie Bazillennachweis. Dieser gelingt schon mikroskopisch leicht, solange, wie vielfach in tuberkulösen Sputen, Bazillen in riesigen Mengen ausgeschieden werden. Er wird jedoch schwierig, wenn nur wenig Bazillen vorhanden sind, und er wird zweifelhaft, wenn die Möglichkeit besteht, daß andere, dem Tuberkelbazillus außerordentlich ähnliche, aber ganz harmlose Bazillen zu diagnostischen Irrtümern führen können. Dann genügen die für gewöhnlich zum Nachweis geübten mikroskopischen Methoden, auch wenn ihnen Anreicherung vorausgeht, nicht mehr. Es muß Kultur- und Tierversuch ausgeführt werden. Lange Zeit galt der Tierversuch als absolut zuverlässig, während der Kultur für diagnostische Zwecke nur geringe oder gar keine Bedeutung zugemessen wurde.

Schon Robert Koch hat auf die Schwierigkeiten hingewiesen, die Tuberkelbazillen ohne Meerschweinchenversuch direkt aus mit Begleitbakterien verunreinigtem Material, also Sputen, Urin u. s. f. zu isolieren. Die Begleitbakterien wachsen viel schneller als die Tuberkelbazillen, und deshalb gelingen die Reinkulturen

in der Regel nicht. Kitasato, Kochs berühmter Schüler, hat zwar mit Kochs Methode vereinzelte Tuberkelbazillenstämme aus Sputen reingezüchtet, aber dieses Verfahren beansprucht sehr viel Geduld, sehr viele Nährböden, und trotzdem muß man mit vielen Fehlschlägen rechnen. Kitasato hat eine dickeitrige Flocke mit der Oese herausgesucht und diese Flocke in 10 bis 15 mit sterilem Wasser gefüllten Petrischalen gewaschen. Das so gereinigte Material hat er dann auf Glycerin-Kartoffelnährböden ausgestrichen und bei 37° C. im Brutschrank bebrütet. In der Folgezeit sind vielerlei Methoden ausprobiert worden, ohne daß sich eine praktisch bewährt hätte. Erst Uhlenhuth hat mit seinem Antiforminverfahren eine bequeme und erfolgreiche Züchtung des Tuberkelbazillus ermöglicht: Man mischt das Sputum mit ungefähr der gleichen Menge 15%igen Antiformins, rührt mit einem Glasstäbchen durch, läßt etwa 20 bis 30 Minuten im Brutschrank stehen, zentrifugiert, wäscht mit steriler Kochsalzlösung mehrmals aus und beimpft dann den Nährboden: Glycerin-Kartoffel. Lange Zeit ist dies das einzige einigermaßen zuverlässige Züchtungsverfahren für Tuberkelbazillen geblieben. Jedoch in der diagnostischen Praxis ist es hinter den Tierversuch zurückgetreten, weil es sich für die Diagnostik als nicht sicher genug erwiesen hat.

Da veröffentlichte im Jahre 1924 Sumiyoshi[1]), ein Schüler Löwensteins in Wien, ein Verfahren, das auf der von Löwenstein beobachteten Resistenz von Tuberkelbazillen gegenüber 10%iger Schwefelsäure beruhte: 200 ccm Sputum werden mit 10 ccm 10%iger Schwefelsäure in einem sterilen Reagensglas gut durchgeschüttelt, bis eine gleichmäßige Emulgierung erfolgt ist; dann läßt man 30 Minuten stehen und zentrifugiert scharf. Darauf wird das Zentrifugat mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gemengt, gut durchgeschüttelt, dann nochmals scharf zentrifugiert und auf Glycerin-Kartoffelnährböden verimpft. Auch aus mit Salzsäure, Milchsäure oder Natronlauge vorbehandelten Auswaschproben konnte Sumiyoshi Tuberkelbazillen in Reinkultur züchten. Er zeigte ferner, daß im Sputum selbst 40%ige Schwefelsäure und 30%ige Salzsäure nicht imstande war, die Tuberkelbazillen abzutöten, auch wenn die Lösung in fünffacher Menge zugesetzt war. Auch bei einer 30%igen Natronlauge waren die Tuberkelbazillen des Sputums noch nach einer Stunde lebensfähig. Durch dieses neue Züchtungsverfahren von

öwenstein und Sumiyoshi wurde der kulturelle Nach-
eis des Tuberkelbazillus mit außerordentlicher Sicherheit mög-
ch. Man kann sagen, daß damit eine neue Aera in der Diagnose
er Tuberkulose begann.

Die von Sumiyoshi verwendete Menge von 200 ccm Sputum
tzten Pesch und Simchowitz[2]) auf 20 ccm herab. Dann
hnitt Hohn[3]) das Verfahren vollends für die Praxis zu.
r verwendete nur noch 2 ccm Sputum und 10 ccm Schwefel-
ure, und bei den andern Materialien, Eiter, Urin u. s. f. ver-
hr er entsprechend. Er benützte 10 %ige, bei starker Verun-
inigung, vor allem im Urin, 12%ige Schwefelsäure, behandelte
is tuberkulöse Material 20 bzw. 30 Minuten in Schüttelröhrchen
nd zentrifugierte 5 Minuten. Dann brachte er das saure unge-
aschene Sediment direkt auf Eiernährböden, die er später
ehrfach modifizierte. Die Züchtungsergebnisse waren außer-
rdentlich günstig, nicht nur bezüglich der positiven Befunde,
ndern auch bezüglich der Zeitdauer, wobei sich die Kultur dem
ierversuch deutlich überlegen zeigte, indem die positiven
umanen Kulturen durchschnittlich beim Auswurf nach 10,5
agen, beim Urin nach 16,5 Tagen erzielt wurden, während beim
ypus bovinus die geringste Zeit 28 Tage, die Durchschnittszeit
3 Tage, und die längste Zeit 64 Tage betrug. Durch diese
nfache Methode vermochte Hohn mit einem sehr hohen Grad
on Sicherheit des Erfolgs die Tuberkelbazillen aus jeglichem,
uch stark verunreinigtem Material herauszuzüchten. Er stand
nher nicht an, zu erklären, daß das Problem der Tuberkel-
zillenzüchtung für die Praxis des Laboratoriums gelöst sei, da
er kulturelle Nachweis des Tuberkelbazillus aus menschlichen
ntzündungsprodukten nunmehr zu einer der einfachsten und
chersten Methoden in der Bakteriologie gehöre.

Die neue Züchtungsmethode wurde von allen Seiten nachge-
üft und ihre Ergebnisse von weitaus den meisten Untersuchern
stätigt.

Dabei aber wurde eine Frage in den Mittelpunkt der Er-
terung gerückt, nämlich die: „Kann das Kulturverfahren den
erversuch ersetzen?“ Bei der Beantwortung dieser Frage, die
s heute noch nicht endgültig entschieden ist, wurden von den
lermeisten Autoren vergleichende Versuchsreihen mit dem
eichen Material angesetzt und dann beobachtet, welche von
iden Methoden, Tierversuch oder Kultur, die meiste Aus-

beute bot, wobei vielfach noch die Ergebnisse mit den klinischen Beobachtungen verglichen wurden. Die allerwenigsten Untersucher aber gingen dann noch dem weiteren Problem nach, ob die gezüchteten Kulturen auch tatsächlich echte Tuberkelbazillen darstellten, das heißt, ob das Kulturverfahren auch absolut spezifisch war.

Ganz besondere Wichtigkeit hat aber diese Frage bekommen, seitdem Löwenstein in einer großen Reihe von Arbeiten[4]) über den Nachweis von Tuberkelbazillen im strömenden Blut nicht nur in einem hohen Prozentsatz der verschiedensten Tuberkuloseformen, sondern auch bei einer Reihe von Erkrankungen, die, wie man bisher annahm, in keiner Beziehung zur Tuberkulose stehen, berichtet hat. Dabei ist, wie auch Kurt Meyer in seiner Umfrage in der „Medizinischen Klinik“[5]) hervorhebt, aus den Arbeiten Löwensteins nicht ganz deutlich zu ersehen, ob es sich bei seinen positiven Befunden stets um makroskopisches Kolonienwachstum gehandelt hat, und ob, sowie auf welche Weise die gezüchteten Bazillen als echte Tuberkelbazillen identifiziert worden sind. Auch in seiner letzten Veröffentlichung „zur Frage der Leistungsfähigkeit von Tierversuch oder Kulturverfahren“ hat Löwenstein[6]) nicht eindeutig angegeben, ob er alle als positiv bezeichneten Kulturen im Tierversuch auf ihre Echtheit geprüft hat. Und wenn Löwenstein in dieser Arbeit sagt, daß, wenn man von den Röhrchen, die nur mikroskopisch Tuberkelbazillen, aber makroskopisch kein Wachstum zeigen, von der ganzen Oberfläche des Nährbodens abstreift und überimpft, in der üblichen Zeit ein reichliches Wachstum erhalte, so trifft das eben auch nicht in allen Fällen zu. Denn Popper, Bodart und Schindler[7]) ist es auffallenderweise auch in der Unterkultur nicht gelungen, derartige mikroskopische Wuchsherde zu sichtbaren Kolonien heranzuziehen, obgleich manchmal bei der mikroskopischen Ueberprüfung der Unterkulturen Stäbchen gefunden wurden, die, anscheinend doch übertragen, nicht heranwachsen. Außerdem machen diese Autoren, genau wie auch Nils Levin[8]), darauf aufmerksam, daß im Blutbodensatz eine Reihe von Stoffen vorkommt, welche die Form säurefester Stäbchen annehmen und so Tuberkelbazillen vortäuschen können.

Aber auch, wenn makroskopisch Kolonien gewachsen sind — und diese Frage betrifft nun nicht nur die Züchtung aus dem

Blut, sondern auch die Kulturen aus allen Entzündungsstoffen —, können säurefeste saprophytische Bakterien bei der makroskopischen und mikroskopischen Betrachtung zu Täuschungen Anlaß geben. Diese sogenannten säurefesten Bazillen haben nämlich zum Teil auch eine ziemlich große Alkohol-Säurefestigkeit. So ist es denn verständlich, daß viele Untersucher eindringlich davor gewarnt haben, nur auf Grund der makroskopischen und mikroskopischen Beurteilung der Kultur die Diagnose „Tuberkelbazillen" zu stellen, so z. B. Blumenberg[9]), Wohlfeil und Jacobi[10]), sowie L. Rabinowitsch-Kempner und van Riemsdyk, ferner K. Walther[11]). Man ist also demnach gehalten, zumindest bei allen auch nur zweifelhaften Kulturen nachträglich noch den Tierversuch anzusetzen, und zwar nicht nur Meerschweinchen, sondern auch Hühner zu impfen, da beim Menschen nicht gar so selten Geflügeltuberkelbazillen gefunden werden, worauf vor allem Löwenstein (a. a. O.) hingewiesen hat.

Damit aber ist man trotz des Kulturverfahrens in vielen Fällen vom Tierversuch nicht losgekommen. Auch die den Kulturverfahren nachgerühmte Abkürzung der Zeitdauer wird dadurch illusorisch.

Dieser Gefahr, daß tuberkelbazillenähnliche säurefeste Saprophyten zu falschen positiven Diagnosen Anlaß geben könnten, suchten schon Löwenstein, Schattner u. A. (scil. Blumenberg) zu begegnen. Sie zeigten, daß Timotheegrasbazillen durch die Säurebehandlung zum Absterben gebracht wurden. Gleichsinnig fielen auch einige von Blumenberg (a. a. O.) angestellte Versuche aus, bei denen Timotheegras- und Smegmabazillen in dünner Aufschwemmung dem Untersuchungsmaterial zugesetzt wurden. Bei diesen Versuchen ist die Zeitdauer der Schwefelsäureeinwirkung nicht angegeben, man muß aber annehmen, daß es die für das diagnostische Verfahren übliche Zeit war, nämlich 20 Minuten. Walther (a. a. O.) benützte zu seinen Prüfungen drei Timotheegrasstämme, einen Smegmastamm, vier Stämme aus dem Harn, zehn Stämme Trompetenbazillen. Die Trompetenbazillen wurden in Speichel, die übrigen in Aqua dest. verrieben und verarbeitet, das Zentrifugat nach Ziehl-Neelsen gefärbt. Timothee-, Smegma- und Harnbazillen konnten mikroskopisch nicht mehr nachgewiesen werden. Trompetenbazillen waren hingegen noch massenhaft vor-

handen. Das Sediment davon wurde auf Eiernährböden ausgestrichen. Nach vier- bis fünfwöchiger Bebrütung gelang bei allen zehn Stämmen die Kultur. Walther zieht daraus die Schlußfolgerung, daß die Trompetenbazillen auch gegen Schwefelsäure sehr widerstandsfähig seien, und Verwechslungen zwischen ihnen und Tuberkelbazillen auch mit dem Hohnschen Verfahren vorläufig nicht zu vermeiden seien. In Fällen, wo die Anwesenheit von Trompetenbazillen im Bereich der Möglichkeit liege, z. B. bei Sputumuntersuchungen der Leute, die auf metallenen Blasinstrumenten spielen, werde man also im Zweifel immer den Tierversuch anwenden müssen.

Bei allen diesen Versuchen wollte man sehen, ob es möglich ist, durch die übliche Schwefelsäurebehandlung der Untersuchungsstoffe die säurefesten Saprophyten auszuschließen. Wie Walther zeigen konnte, gelang dies bei den Trompetenbazillen nicht. Die Zahl der Versuche mit den andern säurefesten Bazillen ist aber viel zu klein, um über die Schwefelsäureresistenz „Säurefester" ein endgültiges Urteil fällen zu können. Man könnte die Trompetenbazillen dadurch auszuschalten versuchen, daß man die Schwefelsäure entweder stärker anwendet, oder aber die Einwirkungszeit der 10%igen Schwefelsäure verlängert. Damit aber werden die Züchtungsergebnisse sicher schlechter, vor allem immer dann, wenn es sich im Untersuchungsstoff schon um geschwächte und geschädigte Tuberkelbazillen handelt. Außerdem müßte zuerst festgestellt werden, bei welcher Schwefelsäurekonzentration, bzw. bei welcher Einwirkungszeit die Trompetenbazillen sicher abgetötet werden. Das ist bis jetzt nicht geschehen, ist auch bei der sicher zu erwartenden äußerst verschiedenen Resistenz der säurefesten Bazillen unsicher.

Man kann aber auch noch einen anderen Weg gehen, den Saleck in einer Serie von Untersuchungen zu verfolgen im Begriff ist. Er will die säurefesten Bazillen nicht bereits bei der Säurebehandlung des Untersuchungsmaterials ausschalten, sondern will versuchen, die Reinkulturen ohne Tierversuch nur bezüglich ihrer Säureesistenz in Tuberkelbazillen und in säurefeste Saprophyten zu scheiden. Er will also feststellen, ob sich Unterschiede in der Schwefelsäureresistenz der herausgezüchteten Reinkulturen von Tuberkelbazillen auf der einen und von säurefesten Bazillen auf der andern Seite ergeben. Dabei wird als günstiger Umstand angesehen, daß die frisch gezüchteten Bazillen sicher

einigermaßen optimale Bedingungen hinsichtlich ihrer Resistenz aufweisen, während dies, wie ja bekannt ist, bei den Bazillen im Ausgangsmaterial durchaus nicht der Fall ist. Wenn es also überhaupt solche Unterschiede der Schwefelsäureresistenz zwischen beiden Kategorien von Bazillen gibt, so dürfte sie auch immer vorhanden sein. Damit aber könnte der Tierversuch endgültig ausgeschaltet werden, außerdem würde die Zeitdauer der gesamten Untersuchung herabgesetzt.

Als Methode für diese Resistenzversuche — man kann sie auch Desinfektionsversuche nennen — dient das neue, von Saleck angegebene Verfahren der Tuberkelbazillenzüchtung.

Mir wurde die Aufgabe gestellt, im Rahmen dieser Untersuchungen die Resistenz säurefester Bazillen gegenüber 10%iger Schwefelsäure zu prüfen.

Bevor Technik und Ergebnisse dieser Versuche beschrieben werden, dürfte es zweckmäßig sein, einen kurzen Ueberblick darüber zu geben, was für Bazillen unter dem Sammelnamen der „säurefesten" Bazillen zusammengefaßt werden, und in welcher Weise sie bisher voneinander unterschieden wurden.

Die Tuberkelbazillen teilen ihre Säurefestigkeit mit einer ganzen Reihe von Stäbchen, die zur Gruppe der Actinomycetalen[12]) gehören, und sich durch Gramfestigkeit, Vielgestaltigkeit der Stäbchen, Bildung von Verzweigungen und kolbigen Endanschwellungen auszeichnen, aber keine Endosporen bilden, und mit geringen Ausnahmen unbeweglich sind. Die Actinomycetalen zerfallen wieder in die Familien der Proactinomyceten mit seltener Mycelbildung, namentlich in älteren Kulturen, und in die der Actinomyceten mit ausgesprochener Mycelbildung. Zu den Proactinomyceten rechnet man zwei Gattungen von Bakterien, nämlich die nicht säurefesten Corynebakterien, zu denen beispielsweise der Löfflersche Diphtheriebazillus gehört, und die säurefesten Mykobakterien. Diese Mykobakterien bilden also die Gattung der sogenannten „säurefesten" Stäbchen. Säurefest werden sie deshalb genannt, weil die mit heißem Karbolfuchsin gefärbten Bazillen den Farbstoff an Säuren mehr oder weniger schwer abgeben. Die Hauptvertreter dieser Gattung sind das auf Körpertemperatur eingestellte Mykobakterium tuberculosis Koch, schlechthin „Tuberkelbazillus" genannt, in seinen Varianten, Typus humanus, bovinus und gallinaceus. Das Myko-

bakterium poicilothermorum ist eine Abart des Tuberkelbazillus. Noch weiter entfernt in der Verwandtschaft mit dem Tuberkelbazillus stehen die Mykobakterien enteritidis und leprae. Außerdem gehören zu der Gruppe der Mykobakterien eine große Anzahl apathogener Arten, die in ihrer Mehrheit schon bei Zimmertemperatur wachsen, und die der Differentialdiagnose zwischen echten Tuberkelbazillen und tuberkelbazillenähnlichen säurefesten Bakterien oft größte Schwierigkeiten bereiten, weil sie teils in der Form, teils in der Kultur dem Tuberkelbazillus außerordentlich gleichen und neben ihm oder isoliert in Körperausscheidungen vorkommen können.

Die bisher am meisten bekannten und erforschten tuberkelbazillenähnlichen säurefesten Stäbchen[13]) sind:

1. Das Mykobakterium smegmatis oder der Smegmabazillus.
2. Mykobakterium phlei oder Gruppe der Timotheegras- oder Moellersche Bazillen.
3. Mykobakterium lacticola oder Gruppe der Butter- und Milch- oder Rabinowitsch-Bazillen.
4. Trompetenbazillen.

Außerdem findet man säurefeste tuberkelbazillenähnliche Stäbchen in Darmausscheidungen von Wiederkäuern, wobei jedoch angenommen werden darf, daß sie sich wohl aus Timotheegrasstämmen herleiten, die von den Tieren mit Gras- oder Heunahrung aufgenommen worden sind. Für die Differentialdiagnose mit menschlichen Tuberkelbazillen spielen sie eine untergeordnete Rolle. Dagegen sind sie wichtig bei veterinärbakteriologischen Untersuchungen*).

1. Das Mykobakterium smegmatis oder der Smegmabazillus.

Er wurde schon 1885 von Alvarez, Tavel und Matterstock an einzelnen Körperstellen, besonders in fettigen Sekretmassen wie im Smegma der Genitalien, besonders bei Frauen gefunden. Andere konnten sie auf der ganzen Körperoberfläche nachweisen. Ihr Hauptverbreitungsgebiet ist jedoch das weibliche Genitale, von dem aus sie im Urinsediment erscheinen.

*) Der Mistbazillus wurde zuerst von Moeller aus Kuhmist isoliert. Auf nahe Verwandtschaft, wenn nicht Identität mit dem Timotheegrasbazillus deutet sowohl die Ockerfarbe als auch die Art seiner Kolonien mit starker Längs- und Querfaltung hin (vgl. Rosenblat (14).

Die Smegmastäbchen sollen nach Angabe der Autoren im Urin meist auf Epithelzellen gelagert sein, während der Tuberkelbazillus keine Beziehung zu Epithelien habe. Moeller empfiehlt zur Vermeidung diagnostischer Irrtümer Katheterurinentnahme.

Morphologisch ist der Smegmabazillus ein kurzes, plumpes Stäbchen, je nach dem Nährboden kann er aber auch schlanke und gekrümmte Form annehmen. Darauf wohl dürfte es zurückzuführen sein, daß in der Literatur Fälle beschrieben sind, wo die verhängnisvolle Verwechslung zwischen Smegma- und Tuberkelbazillen schon zu Nierenexstirpationen geführt hat[15]).

Die Kultur auf Hohnschen Eiernährböden zeigt grauweißen, feuchten Belag. Rosenblat fand, daß Kolonien bei Züchtung in Zimmertemperatur schon nach zwei Tagen sichtbar wurden und einen grauen Belag bildeten, der nach einigen Tagen einen intensiven orangenen Farbton bekam, während er bei einer konstanten Bebrütung bei 37° C. grau-weiß blieb. (Rosenblat a. a. O.). Capuani[16]) bemerkt, daß die Säurefestigkeit des Smegmabazillus variabel sei je nach dem Nährboden und geringer in frischen Kulturen. Für die Differentialdiagnose hat der Smegmabazillus unter den „Säurefesten" wohl die größte Bedeutung. Es besteht daher über ihn eine ausführliche Literatur (vgl. Literaturverzeichnis), in welcher hauptsächlich Angaben zur Vermeidung differentialdiagnostischer Irrtümer gemacht werden, auf welche wir weiter unten noch zurückkommen werden.

2. Mykobakterium phlei oder Gruppe der Timotheegras- oder Moellersche Bazillen.

Der Timotheegrasbazillus hat seinen Namen daher, weil er zuerst von Moeller auf dem Timotheegras entdeckt wurde. In Form und Säurefestigkeit ist er dem Tuberkelbazillus ähnlich. Dagegen ist er in der Temperatur nicht wählerisch. Die Kulturen wachsen schon bei Zimmertemperatur schnell und sind nach 2 Tagen bereits makroskopisch sichtbar. Was ihn ferner vom Tuberkelbazillus unterscheiden kann, ist die intensive orange-rote Farbstoffbildung, obwohl einschränkend zu sagen ist, daß auch Tuberkelbazillen ähnliche Farbstoffe bilden können. Chargaff[17]) hat in jüngster Zeit in einer chemischen Untersuchung die Pigmente der Timotheegrasbakterien erforscht und dabei festgestellt, daß der rote Farbstoff einer rotgefärbten Wachs-

fraktion entspricht, die in drei verschieden gefärbte Zonen (orange, purpurrot und hellgelb) zerfällt und dem Carotin verwandt ist.

Die Kulturen des Moeller-Bazillus sehen im allgemeinen matt aus und sind ockergelb bis orangefarben. Das Wachstum ist vorwiegend in die Höhe gerichtet mit reicher Quer- und Längsfältelung der strahlig zugespitzten Kolonien, die man als Einzelkolonie am treffendsten mit einem Gugelhupf vergleichen kann. Der Belag hat allenthalben scharf umrissene Konturen und steigt bisweilen als Kamhaut an der Glaswand hoch. Rosenblat (a. a. O.) beobachtete bei 28° C. in der Regel Ausbleiben der Fältelung. Ebenso will er Abnahme der Säurefestigkeit bei fortgesetzter Ueberimpfung bemerkt haben.

3. Mykobakterium lacticola oder Gruppe der Butter- und Milch- oder Rabinowitsch-Bazillen.

Säurefeste Stäbchen wurden in Milch und Butter zuerst von L. Rabinowitsch gefunden. Wenn man die zahlreich darüber vorhandene Literatur durchgeht, wird man bemerken, daß es Stämme gibt, welche orange-gelben Farbton haben, mithin dem Moeller-Typ gleichen, während wieder andere weißliche Kulturen bilden. Morphologisch betrachtet zeigt der Rabinowitschbazillus viel längere Stäbchen als der Tuberkelbazillus, weist leichte Krümmung auf und nach einigen Tagen Zerfall, so daß große und kleine Stäbchen im mikroskopischen Bild nebeneinander liegen. Die Bazillen wachsen bei niedriger Temperatur etwas langsamer als bei 37° C.

4. Die Trompetenbazillen.

Der Trompetenbazillus wurde zuerst in den Jahren 1909/10 bei der Untersuchung von Trompetenwasser auf Tuberkelbazillen beobachtet. Nach Jacobitz und Kayser waren 93% aller metallenen Blasinstrumente mit säurefesten Stäbchen behaftet. Dann fand er sich besonders häufig in den schleimigen Niederschlägen an messingnen Wasserleitungshahnen, besonders in Laboratorien (Heim, L., a. a. O.). In jüngster Zeit stellte Eichbaum*) Trompetenbazillen in allen Teilen der Frankfurter

*) Eichbaum, F. a. a. O. Die Frage, ob der Trompetenbazillus sich auch in den Wasserleitungsnetzen anderer Städte findet, hart noch der Erforschung. Für die Sputumentnahme zum mikroskopischen Nachweis von Tuberkelbazillen ergibt sich daraus die Notwendigkeit, das Sputum vor der Mundreinigung zu entnehmen.

Wasserleitung fest. Er nahm an, daß sie aus dem Erdreich dort hineingelangt waren. Ebenso konnte er sie zu 100 %, d. h. in allen gebrauchten Blasinstrumenten aus Messing, Neusilber oder Silber nachweisen. Er fand sie jedoch nie in der Mundhöhle der betreffenden Musiker selbst, obschon er über 100 Zahn- und Mandelabstriche machte, wohl aber gelegentlich im Mundspülwasser und in Zahnbürsten. Er zieht daraus den Schluß, daß die Trompetenbazillen wohl aus dem Frankfurter Wasser via Mund in die Trompeten hineingelangt sein möchten.

Ihre Säurefestigkeit behielten die Trompetenbazillen auch nach zahlreichen Kulturpassagen.

Morphologisch scheint dieser Bazillus in zwei Arten vorzukommen, einem kurzen, plumpen, und einem sehr schlanken Stäbchen, das dem Tuberkelbazillus außerordentlich ähnlich sieht.

Auch in der Kultur gleicht der Trompetenbazillus auffallend dem Tuberkelbazillus, besonders in jungen Kulturen. Bei der ersten Herauszüchtung dauert es etwa 4—6 Wochen, bis die Kolonien makroskopisch sichtbar werden, nachher erscheinen sie in 6—10 Tagen. Er scheint sich also an den Nährboden erst anpassen zu müssen. Diese Beobachtung ist auch von anderer Seite gemacht worden. Vgl. dazu Heim, L., a. a. O.)

II. Bisherige Methoden zur Differenzierung der Mykobakterien.

Nach dem Bekanntwerden der tuberkelbazillenähnlichen Stäbchen bemühte sich die bakteriologische Wissenschaft mit Eifer, brauchbare Methoden und Wege zur Differenzierung der säurefesten Stäbchen zu finden. Alkoholentfärbung zu dem Zweck, um Tuberkelbazillen von Smegmabazillen zu unterscheiden, ist zuerst angegeben worden von Bienstock[18]). Die Ziehl-Neelsensche Vorschrift lautete: 100 g Aq. dest. + 5 g Acid. carbol. cristall. + 1 g Fuchsin + 10 g Alkohol; heiß färben, entfärben mit 5%iger Schwefelsäure. Ziehl[19]) teilte sein Verfahren 1883 und Neelsen[20]) seine Modifikation 1885 mit. Ehrlich[21]) nahm Gentianaviolett + Anilinöl, entfärbte mit 3%iger Salz- oder Salpetersäure ohne Alkohol, der erst durch Bienstock (a. a. O.) und Gottstein[22]) eingeführt wurde.

Die Ergebnisse dieser Studien sind zusammengefaßt in einer Arbeit von A. Weber[23]) in den Veröffentlichungen des Kaiserl.

Gesundheitsamtes. Weber empfiehlt für die Praxis am meisten die Günthersche Methode der Entfärbung mit 3%igem Salzsäurealkohol, wobei die Einwirkungsdauer der Entfärbungsflüssigkeit in zweifelhaften Fällen nach Honsell auf 10 Minuten ausgedehnt werden kann, und die Methode von Ziehl-Neelsen bzw. Ehrlich, wobei der 70%ige Alkohol durch absoluten Alkohol zu ersetzen ist. „Wenn jedoch", fährt Weber fort, „die tuberkelbazillenähnlichen Stäbchen auch diesem Entfärbungsmittel trotzen, wie dies für die von Rabinowitsch und von Dietrich[24]) beobachteten Fälle zutrifft, und wie es ausnahmsweise auch bei Smegmabazillen vorkommen kann, dann lassen allerdings selbst die besten Färbemethoden im Stich. Unter solchen Umständen ist das Kulturverfahren und der Tierversuch heranzuziehen." Vorsicht ist auch geboten bei Urinuntersuchungen (Urogenitaltuberkulose), bei der Untersuchung von Sputen bei Lungengangrän und foetider Bronchitis, sowie des Inhalts von Ovarialcystomen und von Tonsillarpröpfchen, ja überhaupt von fettigen Sekreten im oder am Körper.

Honsell[25]) empfiehlt bei der gewöhnlichen Karbolfuchsinfärbung nach Ziehl-Neelsen 10 Minuten langes Einlegen in 3%igen Salzsäurealkohol, um die Smegmabazillen zu entfärben. Bunge und Trautenroth[26]) arbeiteten im gleichen Sinne und empfehlen die Honsellsche Methode als die sicherste. Kayser[27]) prüfte das Verhalten von tuberkelbazillenähnlichen Stäbchen auf verschiedenen Nährböden. Er erwähnt als differentialdiagnostisch besonders wertvoll die beim Timotheegrasbazillus schon nach 2 Tagen auch bei Zimmertemperatur auftretende Gelb- bis Orangefärbung der Kolonien. Auch heute noch dürfte das rasche Wachstum vieler tuberkelbazillenähnlicher Stämme in 1—3 Tagen schon bei suboptimalen Temperaturen ein sehr wichtiges diagnostisches Merkmal sein, weil ja der Tuberkelbazillus im Kulturverfahren vor dem 8.—10. Tag makroskopisch kein sichtbares Wachstum erkennen läßt und gegenüber anderen Temperaturen als 37° C. sehr empfindlich ist. Farbstoffbildung. Art und Beschaffenheit der Kulturen sind jedoch nach den Erfahrungen der letzten Jahre kein differentialdiagnostisch verwertbares Hilfsmittel mehr. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß die Kulturen des Tuberkelbazillus auf Glycerinkartoffeln je nach der Verwendung roter, blauer oder gelber Kartoffelsorten gelblich, rötlich, ziegel- bis orangerot sein können. (Heim, a. a. O. S. 439.) Ebenso können sie auf Eiernährböden

je nach den Zusätzen Farbstoffe bilden [3]).

Neuerdings (Schloßberger und Pfannenstiel) versuchte man auch serologische Methoden [28]) zur Unterscheidung zu verwenden. Ein Differenzierungsversuch mittels der Komplementbindung erwies sich jedoch als zu unsicher. Als wichtigste Methode zur Differenzierung von Tuberkelbazillen und tuberkelbazillenähnlichen Stäbchen galt bis in die neueste Zeit der Tierversuch. Aber auch gegenüber dieser Methode sind Zweifel aufgetaucht, da Tuberkelbazillenstämme mit abgeschwächter Virulenz beobachtet wurden.

Schwache Virulenz von Tuberkelbazillen beruht nach Uhlenhuth [29]) teils auf Abschwächung des Erregers, teils auf besonderer Resistenz des Versuchstieres. Andererseits konnte Uhlenhuth beobachten, daß avirulente Tuberkelbazillen dann Krankheitserscheinungen machten, wenn sie in einen besonders für Tuberkulose disponierten Organismus hineingelangen. Unter günstigen Bedingungen können Tuberkelbazillen jahrelang ein saprophytisches Dasein fristen, um durch geeignete Tierpassage wieder virulent zu werden. Ebenso kann man auf Grund klinischer Beobachtungen annehmen, daß der Tuberkelbazillus auch im menschlichen Organismus ein saprophytisches Leben führen kann und dabei seine Pathogenität gegenüber Meerschweinchen vollständig einbüßt [31]).

Interessant sind die Angaben von Lydia Rabinowitsch-Kempner [32]), die nach der Methode Löwenstein eine Reihe säurefester Bakterien (5 Stämme) aus dem Blut Lungentuberkulöser züchtete. Im Tierversuch waren die Stämme teils abgeschwächt, teils überhaupt nicht pathogen. Auffallend war die starke Gelbfärbung der Kulturen. Virulenzsteigerung im Tierversuch gelang nicht. Im übrigen nahmen die Stämme an Virulenz eher ab. Aus dem Sputum derselben Patienten konnten zweimal typische Tuberkelbazillen gezüchtet werden. Rabinowitsch sprach daher die Forderung aus, daß heute dem positiven mikroskopischen Befund im Blut notwendig der Kulturnachweis beigefügt werden müsse. Atypische Befunde beim Tierexperiment liegen durchaus im Bereich der Möglichkeit. Nichtsdestoweniger dürfte aber der Tierversuch heute noch die ausschlaggebende Methode zur Differentialdiagnose zwischen säurefesten Stäbchen und Tuberkelbazillen sein. Injiziert man kleine Mengen tuberkelbazillenähnlicher Stäbchen subkutan einem Meer-

schweinchen, so bildet sich lediglich ein lokaler Abscess, der alsbald ausheilt (vgl. Lehmann-Neumann a. a. O. S. 764). Während der Tuberkelbazillus eine chronische Infektionskrankheit macht, deren typische Erscheinungen sich von der dritten bis vierten Woche an zeigen, erreichen die pathologischen Gewebsveränderungen durch Tuberkelbazillenähnliche in der zweiten Woche ihren Höhepunkt. Von da an tritt Rückbildung ein, so daß nach 3—4 Wochen wieder normale anatomische Verhältnisse erreicht sind. Der Vorgang führt jedoch nicht zum Tode des Versuchstieres. Schädigung des Tieres bewirkt jedoch die intraperitoneale Einverleibung großer Bazillenmengen.

Schwere pathologisch-anatomische Veränderungen konnte A. Aujeszky[33]) besonders dann durch tuberkelbazillenähnliche Stämme hervorrufen, wenn er sie zusammen mit Fett intraperitoneal einspritzte. Ferner sind in der Literatur Fälle beschrieben worden, wo Rinder durch Impfung mit lebenden Timotheegrasbazillen ad exitum gekommen sind[34]). Bisher galt in Zweifelsfällen immer noch der Tierversuch als absolut beweiskräftig und ausschlaggebend, berücksichtigt man aber die neuerdings vielfach erhobenen Bedenken, so ergibt sich die Möglichkeit, daß auch der Meerschweinchenversuch — allerdings wohl nur in seltenen Fällen — offenbar auch gelegentlich zu Fehlurteilen führen kann. Man denke nur an die Möglichkeit des Vorliegens einer durch Hühnertuberkelbazillen bedingten Tuberkulose beim Menschen. A. v. Spindler-Egelsen[35]) stellte zuerst ein unterschiedliches Verhalten der Säurefesten gegen Antiformin fest. Er wies nach, daß Smegma-, Gras und Butterbazillen schon nach ½stündiger Einwirkung einer 15%igen Antiforminlösung aufgelöst wurden und dadurch mikroskopisch nicht mehr nachweisbar waren. Kaltblütertuberkelbazillen vom Typus humanus und Typus bovinus waren selbst nach viertägiger Einwirkung einer 50%igen Antiforminlösung noch nicht wesentlich verändert. Auch der Trompetenbazillus erwies sich gegenüber Antiformin scheinbar ebenso widerstandsfähig wie der echte Tuberkelbazillus[36]).

Ueberblickt man diese Versuche zur Differenzierung tuberkelbazillenähnlicher Stäbchen von echten Tuberkelbazillen, so kommt man zu dem Schluß, daß von der Fülle der angegebenen Verfahren die meisten keine genügende Sicherheit beanspruchen

können. Das beste Verfahren ist und bleibt immer noch der Tierversuch.

Ein neuer Weg zur Differenzierung von Tuberkelbazillen und tuberkelbazillenähnlichen säurefesten Stäbchen soll mit Hilfe der von Saleck angegebenen Methode in dieser Arbeit beschritten werden.

III. Eigene Versuchstechnik.

Das Säureverfahren zur Tuberkelbazillenzüchtung hat Saleck bedeutend vereinfacht. Seine Methode ist kurz folgende: Das zur Züchtung bestimmte Material wird auf einem Objektträger genau wie zur Färbung ausgestrichen. Die Ausstriche werden an der Luft getrocknet und dann in ein mit 10%iger Schwefelsäure gefülltes Standgläschen gestellt. Nach einer bestimmten Zeit, meist nach zehn Minuten, wird der Objektträger herausgenommen, der Ausstrich mit einem Graefeschen Starmesser abgestreift und auf Eiernährböden gebracht.

Man braucht also nicht mehr zu schütteln und nicht mehr zu zentrifugieren. Man kann z. B. jeden Sputumausstrich ohne weiteres zur Züchtung verwenden. Dabei ist das Verfahren außerordentlich sicher und zuverlässig. Besonders wichtig für den Zweck unserer Arbeit ist es, daß die Einwirkung der Säure zu jedem beliebigen Zeitpunkt in ganz exakter Weise unterbrochen werden kann.

Die Eiernährböden wurden nach dem ursprünglichen Verfahren Hohns folgendermaßen hergestellt:

Drei frischgelegte Hühnereier, die vorher mit Wasser abgewaschen und dann mit Alkohol gereinigt worden sind, werden oben und unten mit sterilem Skalpell angepickt und in eine sterile mit Glasperlen versehene Schüttelflasche ausgeblasen. Sodann wird etwa 5 Minuten lang geschüttelt, bis Eigelb und Eiweiß eine gleichmäßige Emulsion ergeben. In sterilem Meßzylinder wird auf $^2/_3$ Eiemulsion $^1/_3$ Glycerinbouillon gegeben. Nach Umschütteln werden je ca. 7 ccm in sterile Reagensröhrchen gefüllt und in schräger Lage bei 37° C. ($^1/_4$stündige Einwirkung) zum Erstarren gebracht. Man erhält so einen gleichmäßigen, spiegelnden, schrägen Eiernährboden. Nach Zufügung von je 0,8 ccm Condensbouillon werden die Röhrchen mit ceresingetränkten Cellulosestopfen fest verschlossen.

Die Saleck'sche Objektträgermethode wurde in dieser Arbeit folgendermaßen angewendet:

Methode A:

Von der Kultur werden 2—3 Oesen entnommen, in physiologischer Kochsalzlösung verrieben, dann durch ein steriles Leinwandfilter gegossen und mit steriler Pipette auf sterile Objektträger gebracht. Die so beschickten Objektträger werden in Petrischalen, die man mittels zwischengelegter Holzstäbchen lüftet, getrocknet. Nach 1 -2 Stunden werden die Objektträger mit dem angetrockneten Material den Schalen entnommen und in Standgläschen gestellt, die mit 10%iger Schwefelsäure so gefüllt sind, daß die Schwefelsäure den obersten Rand der Objektträger überragt. Ein Kontrollpräparat wird in ein Standgläschen mit sterilem Aqua destillata gestellt.

Methode B:

Sie besteht aus der Methode A unter Weglassung der Filtration. Diese Behandlungsart bedeutet einerseits eine Vereinfachung der Arbeitsweise, jedoch andererseits eine Erschwerung der Versuchsbedingungen, denn es ist zu erwarten, daß zusammenklebende Bakterienhäufchen auf die Objektträger gelangen und damit die Schwefelsäure nicht so intensiv an alle Stäbchen herankommt. Dadurch konnte möglicherweise die zur Abtötung notwendige Zeit zunehmen.

Methode C:

Weiterhin interessierte die Frage, ob es möglich ist, auch bei der Entnahme vom Nährboden die Methode Saleck, wie er sie zur Reindarstellung von Kulturen der Tuberkelbazillen aus Sputen, Urinsedimenten u. s. f. anwendet, bei unseren Versuchen zu gebrauchen. Der Versuch gestaltet sich folgendermaßen:

Es wird eine Oese der Kolonien vom Nährboden entnommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Ist das Nährbodenkulturmaterial sehr trocken, wie beispielsweise beim Trompetenbazillus, so wird noch eine kleine Oese Aqua dest. hinzugegeben. Nun wird ein zweiter Objektträger auf den ersten gedrückt und zwischen beiden das Material unter Druck sowie Hin- und Herziehen möglichst gleichmäßig ausgestrichen. Getrocknet wird wieder, wie oben beschrieben, in spaltweis geöffneten Petrischalen bei Zimmertemperatur. Bei dieser Methode läßt es sich nicht vermeiden, daß oft dicke Krümel von der Kultur nicht fein verstreichbar sind, sondern sich schon makroskopisch dem Auge

als Bakterien-Konglomerate darbieten.

Als Ergebnis ist dementsprechend eine weitere Heraufsetzung der Abtötungszeit zu erwarten, weil die Möglichkeit besteht, daß die Säure auf die im Innern der Konglomerate liegenden Stäbchen noch schlechter herankommen kann.

Diese Vermutung wurde durch die Versuche bestätigt. Da die Versuchsmethoden B und C nur zur vergleichsweisen Orientierung unternommen wurden, wurden nur wenige Parallelversuche damit gemacht. Die Methode arbeitete an sich zu ungenau, indem von der jeweiligen Dicke des Ausstrichs auch das Ergebnis mehr oder weniger abhängig war. Nur die Methode A mit Leinwandfiltration ermöglichte ein exaktes Arbeiten und kam daher allein für die Differenzierung von Nährbödenkulturmaterial in Betracht.

IV. Versuche in tabellarischer Darstellung und Uebersicht über die Ergebnisse.

Vorbemerkung: Unter „Zeiten" wird die Einwirkungszeit der 10%igen Schwefelsäure verstanden. „K" bedeutet Kontrollversuch mit Vorbehandlung in aqu. dest. Die über den einzelnen Rubriken stehenden Kopfzahlen 1, 2, 3 usw. geben die Zahl der ausgeführten Versuche an. Die leeren Rubriken in den Versuchsreihen zeigen an, daß ein Versuch mit dieser Zeitstufe in der betreffenden Versuchsreihe nicht ausgeführt wurde.

Die beschickten Nährböden wurden bei 37° C. bebrütet.

Untersucht wurden folgende Stämme:

1. Mykobakterium lacticola Stamm 69
2. Mykobakterium smegmatis Stamm 54
3. Mykobakterium lacticola Stamm 19
4. Butterbazillus Rabinowitsch
5. Timotheegrasbazillus Moeller 3318
6. Trompetenbazillus 10

Parallelversuche wurden ausgeführt mit

1. Mykobakterium tuberculosis Koch
   Typus humanus Stamm 1
2. Mykobakterium tuberculosis Koch
   Typus humanus aus Sputum 4041
3. Mykobakterium tuberculosis Koch
   Typus humanus aus Urinsediment.

Stamm Mykobakterium lacticola 69

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3
5			—
10	—	—	—
15			—
20	—	—	—
30			
40			
45			—
50			—
60	—	—	—
70			—
80	—		
100		—	
120	—	—	
K	+	+	+

Sichtbares Wachstum der Kontrolle nach 2 Tagen.

Stamm Smegma 54 Methode A

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3	4
2	—	—	—	—
5	—		—	—
10	—	—	—	—
15	—	—	—	—
20		—		—
25		—	—	—
30	—		—	
40		—		—
K	+	+	+	+

Sichtbares Wachstum der Kontrolle nach 2—3 Tagen.

Stamm Smegma 54 Methode B

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3	4
2	+	+	—	+
5	—	+	+	—
10	—	—	—	—
15	—	—	—	—
20	—	—	—	—
30	—	—	—	—
40	—	—	—	—
50	—	—	—	—
K	+	+	+	+

Sichtbares Wachstum nach 2—3 Tagen.

Stamm Smegma 54 Methode C

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3	4
2	—	+	—	+
5	+	—	+	—
10	—	—	—	—
15	—	—	—	—
20	—	—	—	—
25	—	—	—	—
30	—	—	—	
40	—	—	—	—
K	+	+	+	+

Sichtbares Wachstum nach 2—3 Tagen

Mykobakterium lacticola. Stamm 19

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3	4
5		—		
10	+		—	—
15		—		
20	—		—	—
25		—		
30			—	—
35		—		
40			—	—
45		—		
50			—	—
55		—		
60	—		—	
65		—		
70			—	
75		—		
80	—		—	
100	—			
120	—			
K	+	+	+	

Sichtbares Wachstum nach 3 Tagen.

Stamm Butterbazillus Rabinowitsch Methode A

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3
5	—	—	—
10	+ 1 Kol.	—	—
15	—	—	—
20	—	—	—
25	—	—	—
30	+ 2 Kol.	—	—
35	—	—	—
40	—	—	—
50	—	—	—
70	—	—	—
90	—	—	—
K	+	+	+

Sichtbares Wachstum nach 2—3 Tagen.

Stamm Butterbazillus Rabinowitsch Methode B

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3
5	+ 2 Kol.	—	—
10	—	+ 1 Kol.	—
15	—	—	—
20	—	—	—
25	—	—	—
30	—	—	—
35	—	—	—
40	—	—	—
K	+	+	+

Sichtbares Wachstum nach 2—3 Tagen.

Stamm Butterbazillus Rabinowitsch Methode C

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3
5	+	—	+
10	—	—	—
15	—	—	—
20	—	+ 1 Kol.	—
25	—	—	—
30	—	—	—
35	—	—	—
40	—	—	—
50	—	—	—
60	—	—	—
K	+	+	+

Sichtbares Wachstum nach 2—3 Tagen.

Stamm Trompetenbazillus 10 — Methode A

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3 vergleichsweise mit 15% H_2SO_4 ausgeführt (*)
5	+ massenh.	+ massenh.	—
10	+ massenh.	+ massenh.	+ 2 Kol.
15	+ massenh.	+ massenh.	+ 3 Kol.
20	+ gröss. Rasen	+ massenh.	+ 2 Kol.
25	+ kleinere Rasen	+ gröss. Rasen	—
30	+ 6 Kol.	+ 15 Kol.	— Beginn der Einzelkolon. +
35	+ 7 Kol.	+ 7 Kol.	2 Kol. Umschlag des orangenen Farbtones ins Hellgelbe und auffallendes Kleinerwerden d. Kolonien m. verzögert. Wachstum
40	+ 6 Kol.	+ 4 Kol.	+ 1 Kol.
50	+ 7 Kol.	+ 6 Kol.	—
60	+ 1 Kol.	+ 3 Kol.	—
K	+ massenh.	+ massenh.	+ massenh.

Sichtbares Wachstum nach 3–4 Tagen.

*) Man vergleiche hierzu den Parallelversuch mit Tuberkelbazillen S. 27.

Stamm Timotheegrasbazillus Moeller 3318 — Methode A

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3	4	5	6
5	—	—	—	—	+ 5 Kol. m. verzög. Wachstum	+ 3 Kol. m. verzög. Wachstum
10	—	—	—	—	+	
30	+ 2 Kol.	—	—	—	+ Kol.	+ 1 Kol.
60	—	—	+ mehr Kol.	—	+ Kol.	—
80	—	—	—	—	—	—
90	—	—	—	—	+ 4 Kol.	—
100	—	—	—	—	—	—
120	+ 1 Kol.	—	—	—	+ 2 Kol.	—
140	—	—	—	—	—	—
150	—	—	—	—	+ 3 Kol.	—
160	—	—	—	+ 1 Kol.	—	—
180	—	—	—	—	—	—
K	+	+	+	+	+	+

Sichtbares Wachstum nach 3–4 Tagen bis zu etwa 100 Minuten dauernder Vorbehandlung. Nachher verzögertes Wachstum und kleinere Kolonien.

Stamm Trompetenbazillus 10 Methode A.

Versuche

Zeitangabe	1	2	3	4	5	6	7	8 mit 15 % H_2SO_4
½ Std.	+	+						+ Rasen
1 Std.	Rasen	Rasen						+"
1,20 Std.	+"	+"						+"
1½ Std.			+ sehr dicht					+"
1,40 Std.	+"	+"						+"
2 Std.	+"	+"	+"			+		
2,20 Std.	+"	+"				viel Kol.		+ 12 Kol. + 16 Kol.
2½ Std.			+ weniger Kol.	+ vereinz. Kol.			+ sehr viele Kol.	+ 1 Kol.
2,40 Std.	+"	+"						—
3 Std.	+ wenig Kol.	+ wenig Kol.	+"	+"		+"	+"	—
3½ Std.				+"	+ viel Kol.			2 + Kol.
4 Std.			+ vereinz. Kol.	+"				
4½ Std.			+"	+ ganz vereinz. Kol.				
5 Std.			+"	+"				
3½ Std.			+"	+"				
6 Std				+"		+ wenig Kol.		
6½ Std.					+ viel Kol.			
7 Std.					+"	+"		
7½ Std.					+"			
8 Std.					+"	+ 1 Kol.		
8½ Std.					+ wenig Kol.			
9 Std.					+"	+ wenig Kol.		
9½ Std.					—			
14 Std.						+ 1 Kol.	+"	
15 Std.								
K	+	+	+		+	+	+	+

NB.: Von den Versuchen mit der Methode B und C wurde abgesehen, weil sich namentlich bei C massenhaftes Rasenwachstum noch nach mehrstündiger Einwirkung zeigte.

Stamm Timotheegrasbazillus Moeller 3318 Methode B

Versuche

Zeiten in Minuten	1	2	3	4
5	+ 3 Kol.	+ 6 Kol.		
10	+ 3 Kol.	+ 1 Kol.		
15	+ 7 Kol.	+ 10 Kol.		
20	+ 7 Kol.	+ 6 Kol.		
25	+ 7 Kol.	+ 8 Kol.		
30	+ 9 Kol.	+ 10 Kol,		Umschlag von Orange in Hellgelb
35	+ 6 Kol.	+ 4 Kol.		
40	+ 4 Kol.	+ 2 Kol.		
45	+ 3 Kol.	+ 1 Kol.		
50	+ 3 Kol.	+ 2 Kol.		
60	+ 2 Kol.	+ 1 Kol.		
80	—	+ 4 Kol.		
100	+ 1 Kol.	—		
120	—	—		
140	+ 2 Kol.	—		
160	—	+ 1 Kol.		
180	—	—		
K	+	+	+	massenhaftes Wachstum in dichtem Rasen

Sichtbares Wachstum nach 3—4 Tagen bis zu etwa 100 Minuten dauernder Vorbehandlung. Nachher verzögertes Wachstum und kleinere Kolonien.

Die untersuchten Stämme zeigten gegenüber 10%iger Schwefelsäure ganz verschiedene Widerstandsfähigkeit. Die geringste Resistenz hatte der Stamm Mykobakterium lacticola 69. Er wuchs schon nach 5 minutenlanger Säureeinwirkung nicht mehr. Ihm kam nahe Smegma 54. der mit Methode A schon nach 2 Minuten abgetötet war, während er bei Methode B (ohne Filtration) in zwei Versuchen nach 5 Minuten langer Schwefelsäurebehandlung noch Wachstum zeigte. Ebenso wuchs er in zwei Fällen bei Anwendung der Methode C (Objektträgerabklatsch) noch nach

Parallelversuche mit Tuberkellbazillen nach der Methode Saleck.

Zeiten in Minuten	Stamm hum. 1	Stamm 40/41	Stamm hum. (*)	Stamm aus Urinsed
			ausnahms. m. 15%ig. H_2SO_4 ausgeführt	
5			+	
10		+	+	
20			+	
30	+	+	+	+
40	+		+	
50	+	+	+	
55			+	
60	+		+	+
65			+	
70	+	+	+	
75			+	
80	+			
90	+	+		+
100	+			
110	+	+		
120	+			+
130	+	+		
150	+	+		+
170		+		
180		+		+
190		+		+
200		+		+
240		+		+
K	+	+	+	+

Sichtbares Wachstum nach 8—10 Tagen in dichten Rasen.
*) Man vergleiche dazu die Fußnote auf S. 24

Minuten Vorbehandlung. An dritter Stelle stand Mykobakterium icticola 19, das in vier Versuchsreihen, die mit Methode A usgeführt wurden, einmal nach 10 minutenlanger Vorbehandlung it Schwefelsäure noch Wachstum zeigte, sonst aber von 5 bis 20 Minuten Säureeinwirkung steril blieb.

Es folgten sodann der Butterbazillus Rabinowitsch, er mit der Methode A unter drei Versuchen einmal nach 10 und ach 30 Minuten noch eine bzw. zwei Kolonien bilden konnte. benso wuchsen mit der Methode B nach 5 Minuten noch eine und ach 10 Minuten noch zwei Kolonien. Mit der Methode C trat bei nem Versuch nach 20 Minuten eine einzige Kolonie auf.

Resistenter zeigte sich der Timotheegrasbazillus 3318. Nach 35 inuten langer Vorbehandlung zeigte er einen in allen Verchen konstanten Farbumschlag von Orange ins Hellgelbe. Nach 0 Minuten Vorbehandlung wuchs er farblos. Mit der Methode A ldete er schon nach 5 Minuten Vorbehandlung keinen zu-

sammenhängenden Rasen mehr, wie in den Kontrollversuchen, sondern nur noch Einzelkolonien (1—3—5). Allerdings konnten bei 6 Versuchen zweimal noch nach 20 Minuten je 1 und 2 Kolonien wachsen, nach 150 Minuten bei einem Versuch 3 Kolonien, und sogar nach 160 Minuten konnte einmal eine Kolonie entstehen. Ohne Filtration (Methode B) waren die Kolonien, welche wuchsen, lediglich etwas vermehrt (4—7—10): einmal waren es sogar nach 25 Minuten noch 15 Kolonien. Mit der Objektträgermethode C wuchs der Timotheegrasbazillus bis zu 25 Minuten in zusammenhängendem Rasen mit zahlreichen Kolonien; von 30 Minuten ab konnte er jedoch nur noch Einzelkolonien bilden. Um das Bild weiter zu klären, wurde der Timotheegrasbazillus mit der Objektträgermethode bei einem Parallelversuch mit 15%iger Schwefelsäure vorbehandelt. Dabei wuchs er von Anfang an nur in einzelnen Kolonien (1—2—3) bis 40 Minuten, von da ab blieben die angelegten Kulturen steril. Ein Parallelversuch mit Tuberkelbazillen zeigte bei gleichen Zeiten und darüber hinaus schon nach 10 Tagen makroskopisch sichtbaren dichten Rasen. Keinerlei differentialdiagnostische Schwierigkeiten entstehen also bei den von mir untersuchten Mykobakterien lacticola, smegmatis und Rabinowitsch (Butter). Auch der Timotheegrasbazillus dürfte insofern keine Schwierigkeiten bereiten, als er nach unseren Versuchen im Gegensatz zum Tuberkelbazillus von 30 Minuten an nur noch in vereinzelten Kolonien wuchs. Diese zeigten absolut keine Ausbreitungstendenz mehr und waren auch nach dem Umschütteln der Condensbouillon auf den Nährböden zu keinem weiteren Wachstum mehr anzuregen, während es bei Kulturen von Versuchen unter 30 Minuten dann zu Kamhautbildung und Vermehrung der Kolonien kam. Der Tuberkelbazillus konnte im Gegensatz zum Timotheegrasbazillus nach mehreren Stunden Säurevorbehandlung noch dichte Rasen mit massenhaft Kolonien bilden.

Anders jedoch verhält es sich mit dem Trompetenbazillus, der in der Säurefestigkeit dem Tuberkelbazillus so nahe zu stehen scheint, daß eine Verwechslung nur allzuleicht möglich sein könnte. Auch sind die Kulturen der Trompeten- und Tuberkelbazillen besonders im Jugendstadium kaum voneinander zu unterscheiden. Morphologisch sind beide Arten von Stäbchen sich sehr ähnlich. Trotzdem scheint eine Differenzierung zwischen Trompetenbazillus und Tuberkelbazillus im Bereich der Möglich-

keit zu liegen. Um dieser Frage näher zu kommen, machte ich einen Parallelversuch mit 15%iger Schwefelsäurevorbehandlung des Trompeten- sowohl als des Tuberkelbazillus. Ohne mit diesem einen Versuch eine Verallgemeinerung aussprechen zu wollen, zeigte sich doch ein Unterschied im Wachstum beider Arten. Der Trompetenbazillus bildete dichte Rasen mit auffallend kleineren Kolonien bis zu 100 Minuten dauernder Säureeinwirkung; von 120 Minuten ab wuchs er in vereinzelten Kolonien, während der Tuberkelbazillus im Gegensatz dazu nach der gleichen Zeit dichte Rasen bildete. Auch die Resistenzversuche mit 10%iger Schwefelsäure zeigten bei entsprechend länger dauernder Einwirkung der Säure ($2^1/_2$—3 Stunden) eine stärkere Abtötung der Trompetenbazillen, was im Einzelwachstum von Kolonien zum Ausdruck kam, während der Tuberkelbazillus imstande war, auch dann noch dichte Rasen zu bilden.

Allerdings kommen sich beide Arten, wenn man noch längere Zeiten anwendet, wie dies Saleck bereits getan hat, ziemlich nahe, so daß eine endgültige Scheidung zwischen Trompetenbazillen und Tuberkelbazillen in praktisch anwendbaren Zeiten mit 10%iger Schwefelsäure nicht möglich ist. Hier müssen weitere Versuche Klärung schaffen.

Ueberblickt man die Ergebnisse dieser Versuche hinsichtlich des uns bei diesen Untersuchungen leitenden Gedankens, so ist folgendes zu sagen.

Es gelingt durch Einwirkung von 10%iger Schwefelsäure ohne weiteres, die von uns untersuchten tuberkelbazillenähnlichen säurefesten Stäbchen, nämlich Mykobakterium lacticola 19 und 69, Mykobakterium smegmatis 54 und den Butterbazillus Rabinowitsch auszuschließen. Schwieriger wird es beim Moellerschen Timotheegrasbazillus 3318, aber auch hier sind deutliche Unterschiede vorhanden. Dagegen ist es bis jetzt unmöglich, den Trompetenbazillus vom Tuberkelbazillus mit Hilfe der 10%igen Schwefelsäurevorbehandlung zu unterscheiden.

Wenn man diese Versuchsergebnisse bezüglich ihrer Auswirkung für die Praxis ansieht, so ist also zu sagen, daß nur die Trompetenbazillen bei der Untersuchung mit der Saleckschen Methode noch differentialdiagnostische Schwierigkeiten bereiten. Da es jedoch nur relativ wenig Menschen gibt, die mit metallenen Blasinstrumenten in Berührung kommen, so hat diese Schwierigkeit nicht so sehr viel zu besagen, zumal Eichbaum a. a. O.

ausdrücklich feststellt, daß er trotz der Verunreinigung der Frankfurter Wasserleitung mit Trompetenbazillen diese niemals in der Mundhöhle von Menschen und auch nicht von Musikern gefunden hat. Als Gesamtergebnis dieser Untersuchungen muß also festgehalten werden, daß es mittels des Differenzierungsverfahrens in 10%iger Schwefelsäure mit der Methode von Saleck gelingt, alle bis jetzt untersuchten säurefesten Bazillen mit Ausnahme des Trompetenbazillus leicht und in kurzer Zeit unter Ausschaltung des Tierversuchs von Tuberkelbazillen zu unterscheiden. Dieses Ergebnis darf allerdings noch nicht als endgültig angesehen werden, es soll vielmehr dazu anregen, weitere Untersuchungen mit vielen tuberkelbazillenähnlichen- und Tuberkelbazillenstämmen und verschiedenen Konzentrationen von Schwefelsäure anzustellen.

Erst wenn alle weiteren, auf ganz breiter Basis angestellten Versuche zum gleichen Ergebnis führen, darf diese Methode der Differenzierung in der Praxis angewendet werden.

Zusammenfassung:

Die Widerstandsfähigkeit säurefester Bazillen gegenüber 10%iger Schwefelsäure wurde mit der Saleckschen Objektträgermethode untersucht. Dabei ergab sich

1. Am leichtesten war der Stamm Mykobakterium lacticola 69 abzutöten, der nach 5 Minuten dauernder Säureeinwirkung nicht mehr wuchs. Dann folgte der Smegmabazillenstamm mit einer Abtötungszeit von 10 Minuten. Diesem reihte sich an der Stamm Mykobakterium lacticola 19 mit 15 Minuten. Butterbazillus Rabinowitsch war von 35 Minuten ab steril. Die Moellerschen Timotheegrasbazillen wuchsen nach 40 Minuten nur noch in vereinzelten Kolonien, Rasenbildung kam nicht mehr zustande. Dadurch ergab sich ein typischer Unterschied zum Tuberkelbazillus. Allerdings konnten vereinzelt noch nach 120 und 160 Minuten 1—3 Einzelkolonien vom Timotheegrasbazillus angehen.

   Dies hat jedoch für die praktische Unterscheidung der Bazillen gegenüber den Tuberkelbazillen keine Bedeutung.
2. Die Trompetenbazillen waren am widerstandsfähigsten. Sie widerstanden der Wirkung 10%iger Schwefelsäure bis zu 24 Stunden und ließen sich mit der angewandten Versuchsanordnung nicht mit Sicherheit von den Tuberkelbazillen unterscheiden.

3. Mit der hier beschriebenen Methode scheint ein Weg zur Unterscheidung von Tuberkelbazillen vom Typus humanus und tuberkelbazillenähnlichen Stäbchen gefunden zu sein, durch den der Tierversuch überflüssig wird. Um ein endgültiges Urteil zu bekommen, müssen aber noch weitere Versuche mit stärkerer Schwefelsäurekonzentration und mit vielen Stämmen angestellt werden. Diese Untersuchungen sind im Gang.

Zum Schluß erlaube ich mir, Herrn Prof. Dr. Wolf für die freundliche Aufnahme in seinem Institut, und Herrn Privatdozent Dr. Saleck für die Anregung zu dieser Arbeit und die mir gewährte gütige Unterstützung ergebenst zu danken.

Lebenslauf

Am 17. September 1894 wurde ich, Friedrich Wilhelm van Gelder, als Sohn des Apothekers Hermann van Gelder und seiner Ehefrau Anna, geb. Emmel zu Rindern im Kreise Cleve (Rheinprovinz) geboren. Nach vierjährigem Besuch der Volksschule zu Cleve kam ich an das dortige humanistische Gymnasium. Nach der Uebersiedlung meiner Eltern nach Koblenz a. Rh. bezog ich im Jahre 1907 das humanistische Kaiserin-Augusta-Gymnasium daselbst. Dieses verließ ich mit dem Zeugnis der Reife im Frühjahr 1914, um Philologie, insbesondere Geschichte zu studieren. Diesem Studium lag ich an den Universitäten Bonn und Berlin ob. Als ich im Weltkrieg wegen schwerer Erkrankung aus dem Heeresdienst entlassen wurde, übernahm ich in den Jahren 1917 und 1918 freiwillig den Schuldienst für einberufene Lehrer am Realgymnasium in Koblenz. Im Jahre 1924 wurde ich auf Grund einer als „sehr gut" befundenen Schrift aus dem Gebiet der mittelalterlichen Verfassungs- und Rechtsgeschichte von der Philosophischen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität zu Bonn zum Dr. phil. promoviert.

Seit dem Jahre 1927 widmete ich mich dem Studium der Medizin an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen. (Physikum W.S. 1929/30, ärztliche Prüfung 6. Febr. 1933).

Allen meinen Lehrern sei auch an dieser Stelle herzlich gedankt.

Literaturverzeichnis.

1. Sumiyoshi: Z. f. Tuberkulose 39 (1924) S. 333.
2. Pesch und Simchowitz: Münchn. med. Wochenschr. 1925. S. 1592.
3. Hohn, J.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 98 (1926) S. 460.
4. Löwenstein: Literaturangaben seiner Arbeiten siehe am Ende der Arbeit 6.
5. Meyer, K.: Med. Klinik. 1932. S. 110.
6. Löwenstein: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 123 (1932) S. 510.
7. Popper, H., Bodart, F. und Schindler, W.: Virchows Arch. 286 (1932) S. 615.
8. Nils Levin: Med. Klinik 1932 S. 289.
9. Blumenberg, W.: Med. Klinik 1929 S. 1136.
10. Wohlfeil. T. und Jacobi, J.: Med. Klinik 1929, S. 1025.
11. Walther, K.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 115 (1930) S. 235.
12. Lehmann, K. B. und Neumann, R. O.: Bakteriologie insbesondere bakteriologische Diagnostik. Lehmanns med. Atlanten. 7. Aufl. (München 1927) X, 2, S. 674 ff.
13. Heim, L.: Handbuch der Bakteriologie. 5. Aufl. Stuttgart 1918. S. 433 ff. u. S. 450 ff.
14. Rosenblat, St.: Zur Kenntnis der zur Gruppe der Tuberkelbazillen gehörenden säurefesten Mikroorganismen. Diss. Zürich 1905.
15. Eichbaum, F.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 127 (1932) S. 65 ff.
16. Capuani, G. F.: Boll. Ist. siero ter. milan. 9, (1930) S. 197. Ref. in Ztbl. f. ges. Hyg. 23 (1931) S. 831.
17. Chargaff, E.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 119 (1930) S. 121.
18. Bienstock: Fortschr. d. Medizin. 1886 Nr. 6.
19. Ziehl: Deutsche med. Wochenschr. 1883 Nr. 5.
20. Neelsen: Fortschritte der Medizin. 1885 Nr. 7. S. 200 (Anm.).
21. Ehrlich: Deutsche med. Wochenschr. 1882 Nr. 19 und Charité Annalen 1886 S. 123.
22. Gottstein: Fortschr. der Medizin. 1886 Nr. 8.
23. Weber, A.: Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 19 (1903) S. 251.
24. Dietrich: Berliner klin. Wochenschr. 1899 Nr. 9.
25. Honsell: Arbeiten aus dem Geb. d. path. Anat. u. Bakt. v. Baumgarten 2 (1896).
26. Bunge und Trautenroth: Fortschr. d. Medizin. Bd. 14 (1896) Nr. 23, 24.
27. Kayser: Beitrag zur Differentialdiagnose zwischen den echten Tuberkelbazillen und den beiden säurefesten Bazillen Timothee und Butter. Diss. Rostock. 1902.
28. Schloßberger und Pfannenstiel: Ztschr. f. Hyg. 95 (1922) S. 77.
29. Uhlenhuth und Seiffert: Ztschr. f. Immunitätsforschung 69 (1930/31) S. 187.
31. Fontes, A.: Ref. in Ztbl. f. ges. Hyg. 24 (1931) S. 694.
32. Rabinowitsch Kempner, L.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. 107 Ref. (1932) S. 33.
33. Aujeszky, A.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 36 (1904) S. 415.
34. Moeller: Deutsche med. Wochenschr. 1902 S. 484.
35. v. Spindler-Engelsen, A.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 76 (1915) S. 356.
36. Schern, K. und Dold, H.: Arbeiten a. d. Kaiserl. Gesundheitsamt 38 (1912) S. 205

Außerdem wurden noch folgende Arbeiten benützt:

Bruns, H.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. 17 (1895) S. 817.
Czaplewski: Münchn. med. Wochenschr. 1897 S. 1192.
Fraenkel: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. 29 (1901) S. 1.
Möllers, B.: Die Tuberkelbazillen. In: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 2. Aufl. hgg. v. Kolle und Wassermann V, 2, S. 615 ff.
Hohn, Jos.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. 127 (1932) S. 59.
Lange: Deutsche med. Wochenschr. 1920 S. 763. 1921, S. 528.
Lange: Ztschr. f. Hyg. 93 (1921) S. 43.
Lubarsch: Ztschr. f. Hyg. 31 (1899) S. 187.
Moeller, A.: Therapeut. Monatsh. 1898 S. 607.
Moeller, A.: Ztbl. f. Bakt. 25 (1899) S. 369.
Moeller, A.: Ztbl. f. Bakt. I. Abt. 30 (1901) S. 513.
Neufeld, L.: Arch. f. Hyg. 39 (1901) S. 184.